

【要約】

修士課程優秀論文

小胞体関連分解(ERAD)分子Herpの発現減少による α -synuclein毒性の軽減Decreased expression of ERAD molecule, Herp, reduces α -synuclein toxicity

金沢大学大学院医学系研究科神経分子標的学
(解剖学第三)

三 浦 比 佳 理

【はじめに】

パーキンソン病と α -synuclein

パーキンソン病(PD)は、黒質緻密層におけるドーパミン作動性神経の脱落と、Lewy小体とよばれる細胞質封入体を病理学的特徴とする、進行性神経変性疾患である。Lewy小体の主要構成成分である α -synuclein蛋白は、神経細胞内、特にプレシナプス領域に多く発現している。家族性PDのPARK1においては α -synucleinの点突然変異が、PERK4においては α -synuclein遺伝子を含む17-19個の遺伝子領域の三重複²⁾が原因であることが報告されている。一方、孤発性PDにおいては、酸化ストレスやミトコンドリアの機能障害により、ユビキチン-プロテアソームシステム(UPS)が障害され、 α -synucleinの分解が抑制されているのではないかと推測されている。つまり、 α -synuclein変異体の存在、または野生型 α -synucleinの量的増加が自身のミスフォールド化を促進し、最終的にLewy小体形成を促進していると考えられている。 α -synucleinの増加がPDの原因となるであろうことは、 α -synucleinを過剰発現させたモデル動物による研究で、それらの動物がPD様の症状を示すことから支持されている³⁾。ただし、Lewy小体が直接PDにおける細胞死の原因となっているかどうかは現在の所不明で、ミスフォールド化した α -synucleinがLewy小体を形成するまでの中間体が細胞毒性を発揮するという仮説も提唱されている³⁾。いずれにしても、 α -synucleinの発現及び毒性を制御する事は、PDの治療を考える上から極めて重要である。

Herp (homocystein-induced ER protein)

我々は、小胞体におけるストレス応答を研究する過程で、Herp (homocystein-induced ER protein)遺伝子をクローニングした。Herpは、小胞体ストレスにより発現が誘導され、小胞体ストレス由来の細胞死を抑制する⁴⁾。Herpの直接的な機能については、小胞体内のミスフォールド蛋白質を細胞質へと輸送し、UPSで分解するシステムである小胞体関連分解(ER-associated degradation; ERAD)との関連が示唆されている。また、Herpはそれ自身がERAD基質であり、UPSで迅速に分解されるため、特にUPSが障害されている状態では細胞内で凝集しやすく、sporadic inclusion-body myositisという疾患において β -amyloidと共に細胞内凝集体を形成している。つまり、Herpは、小胞体に対して細胞保護因子として働いているが、UPSに対しては蛋白負荷を増大させ、他のUPS基質の分解を遅延させている可能性がある。

そこで我々は、Herpの発現減少がUPS基質である2種類の蛋

白質、 α -synuclein及びその結合蛋白質synphilin-1の分解・可溶性、そして細胞毒性に対して与える影響について、Herpノックダウン(KD)細胞及び野生型(WT)細胞を用いて検討した。

【結果】

小胞体ストレス及びUPS障害下におけるHerpの発現

SH-SY5Y細胞を小胞体ストレス剤unicamycin(Tm)またはプロテアソーム阻害剤MG132で処理するとHerpの発現量は蛋白レベルで増加した。Tmで細胞を処理した場合は、可溶分画のみにHerpの発現を認めたが、MG132で処理した場合は可溶分画及び不溶分画の両方に認めた。また、MG132で処理した細胞の不溶分画にはユビキチン化された蛋白の蓄積も認めた。一方、転写レベルでHerpの発現を検討してみると、Tmで処理した細胞においてはHerpの発現が誘導されていたが、MG132を投与した細胞においてはHerpの発現はほとんど誘導されていなかった。これらの事は、MG132処理によりHerpの分解が阻害されていることを示唆している。実際、MG132で処理した細胞において、Herpは主にユビキチン(Ub)(+)かつ α -synuclein(+)凝集体(アグリソーム)に存在していた。

Herp KD細胞の作製

siRNAを用いてHerp KD細胞を作製した。Herp siRNAを導入したHEK293T細胞においてHerpの発現は蛋白レベルで20%以下まで低下したが、小胞体局在分子シャペロンcalnexin, GRP94, GRP78, 細胞質局在分子シャペロンHsp70, およびERAD因子Derlin-1の発現に変化はなかった。一方、control siRNAを導入した場合は、Herpの発現量は変化しなかった。

Herp KDと α -synuclein及びsynphilin-1の分解

Herp KDが α -synuclein及びsynphilin-1の分解に与える影響について検討するために、³⁵S-Met/Cysを用いてパルス-チェイス実験を行った。 α -synuclein蛋白は、チェイス12時間後には、WT細胞においては62%、Herp KD細胞においては20%にまで減少していた。synphilin-1蛋白は、チェイス24時間後には、WT細胞においては40%、Herp KD細胞においては7%にまで減少していた。つまり、WT細胞に比べてHerp KD細胞において、両蛋白質の分解が促進していた。

Herp KDと α -synuclein及びsynphilin-1の可溶性

次に、Herp KDにより促進される α -synuclein及びsynphilin-1の分解と、両蛋白の可溶性の関係について検討するために、WT細胞およびHerp KD細胞を蛋白質合成阻害剤cycloheximide(Cx)で処理した後、RIPA bufferにて溶解し、不溶物を1%SDS

bufferで溶解して、Western blottingを行った。定常状態では明らかではなかったが、Cx処理した場合、WT細胞に比べてHerp KD細胞において不溶分画の α -synucleinが減少していた。同様に、synphilin-1も、WT細胞に比べてHerp KD細胞において、不溶分画量が減少していた。

Herp KDと α -synuclein及びsynphilin-1の細胞毒性

さらに、Herp KDが α -synucleinとsynphilin-1の細胞毒性に与える影響を検討した。まず、両蛋白を発現させないHEK293T細胞(WT及びHerp KD細胞)をMG132で処理し、24時間後にMTTアッセイによりviabilityを評価した。MG132濃度の上昇と共に細胞のviabilityが低下したが、Herp KD細胞においてはWT細胞に比べてviabilityが約5-10%高かった。次に、 α -synucleinを強制発現させたHEK293細胞(WT及びHerp KD細胞)において同様の実験を行った。WT細胞において、 α -synucleinの強制発現によりviabilityは約25%低下し、MG132の投与によってプロテアソームの機能を障害するとさらにviabilityは低下した。ところが、 α -synucleinを強制発現させたHerp KD細胞においては、15-25% viabilityが改善していた。synphilin-1を強制発現したHEK293細胞においても、WT細胞に比べてHerp KD細胞のほうが10-15%程度viabilityが高かった。

【考察】

パーキンソン病の病態形成に重要な役割を果たしている蛋白質 α -synucleinの発現・凝集を抑制し、神経細胞死を抑制しようとする試みは、病態解明及び新たな治療法開発の観点から極めて重要である。これまで、細胞質に存在する分子シャペロンHSP70を強制発現することにより α -synucleinの凝集を抑制する方法や、ParkinやSH3A等のE3リガーゼを強制発現する事により、UPSによる α -synucleinの分解を促進する方法などが開発されている。しかし、外因性に分子シャペロンやE3リガーゼを発現させ、細胞内で機能させるためには、多くの細胞内ATPが必要になり、細胞に新たな負荷をかけることにもつながる。一方、小胞体のストレス応答の一つであるERADは、小胞体の負荷を減少させるシステムであるが、UPSに対しては逆に負荷を増加させてしまう側面を持っている。実際、ERADの一部を制御してUPSの負荷を減少させると、ポリグルタミンによる神経細胞死は抑制された⁹⁾。ERADを過度に抑制してしまうと、細胞が小胞体ストレスに対して脆弱になる可能性があるが、抑制程度をコントロールしたり、細胞内に存在するERAD以外のストレス応答(分子シャペロンの誘導など)を活用することで、小胞体ストレス由来の細胞死を回避することは可能であると考えられる。また、特定のERAD基質を選択的に減少させる方法も、小胞体に対して新たな負荷を加えない点で、極めて有効な方法であると考えられる。

本研究において、我々は、siRNA法を用いて、機能的にERADに関連し、自身もERAD基質であるHerpの発現をWT細胞の約20%以下まで低下させた細胞を作製した。Herp KD細胞においては、他のUPS基質 α -synuclein及びsynphilin-1の分解が促進され、同蛋白の不溶分画に存在する割合も減少し、さらに細胞毒性も減少していた。現在の所、Herpの発現減少により、細胞内のERAD活性がどの程度低下したかは不明であるが、

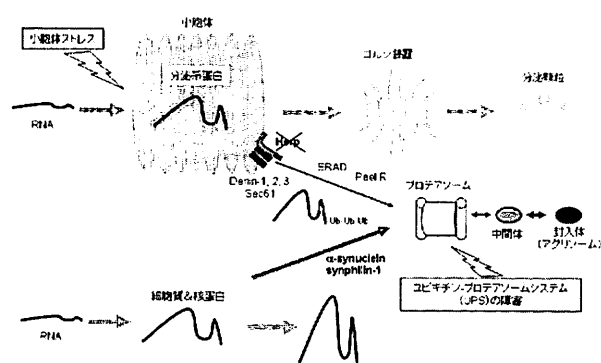


図 小胞体ストレスとUPS障害に対するHerpの発現の影響

Western blottingの結果から、少なくとも細胞に新たな小胞体ストレスが加わる程には至っていないと考えられる。つまり、今回の結果は、ERAD全体が抑制された結果というよりは、内在性のERAD基質Herpが選択的に減少したことによる可能性が高いと推測される。

今後、同様の実験をHerpノックアウト細胞及びノックアウトマウスでも実施すると共に、Derlin-1, 2, 3等、他のERAD関連分子についてもsiRNA法を用いて検討していきたいと考えている(図)。

【結語】

HerpはUPS障害下の細胞において、Ub(+)かつ α -synuclein(+)凝集体に存在していることを認めた。また、WT細胞に比べてHerp KD細胞においては、 α -synuclein及びsynphilin-1の分解が促進され、不溶分画に存在する割合が減少していること、さらには α -synucleinによる細胞毒性が減少していることを認めた。以上のことから、Herpの発現を減少させると、細胞質蛋白(α -synuclein及びsynphilin-1)のプロテアソームでの分解が促進され、凝集体の形成が減少し、結果として細胞死が抑制される可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Polymeropoulos M. H. et al. : Science, 276, 2045-2047, 1997
- 2) Grimes D. A. et al. : Mov. Disord., 17, 1205-1212, 2002
- 3) Goldberg, M. S. et al. : Nat. Cell Biol., 2, E115-119, 2000
- 4) Hori O. et al. : Genes to Cells, 9, 457-469, 2004
- 5) Kanuka H. et al. : PNAS, 100, 11723-11728, 2003

Profile

2006年3月 弘前大学 農学生命科学部
応用生命工学科 卒業
2008年3月 金沢大学大学院 医学系研究
科 修士課程 修了
同年4月～ 金沢大学大学院 医学系研究
科 博士課程 在籍中

